

[原 著]

見逃されやすいチミジン依存性 Methicillin-resistant
Staphylococcus aureus の性状谷本綾子¹⁾・藤原弘光¹⁾・田仲祐子¹⁾・中本幸子²⁾¹⁾ 鳥取大学医学附属病院検査部²⁾ 鳥取大学医学部保健学科

(平成 17 年 3 月 22 日受付, 平成 17 年 10 月 3 日受理)

敗血症患者から分離した methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) は、繰り返して分離しても血液寒天培地では小型で大きさの不定な集落を形成した。これらの集落のうち集落形態の異なる 3 種類の菌株 (T-1~T-3) を再分離して性状を調べた。分離した T-1 株は Mueller-Hinton 寒天培地 (M-H 寒天培地) に接種した菌量の一部は集落形成できるが、他の株 (T-2, T-3) はできなかった。これらの 3 株は MRSA としての性状を有し、pulse-field gel electrophoresis で調べると同一パターンで、表現型においては異なるが clonal な variant, すなわち小型コロニー変種 (small colony variants; SCVs) であることが示唆された。これらの株を *S. aureus* や *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Salmonella* Enteritidis などと M-H 寒天培地で共培養すると集落形成し、発育が認められた。このことはこの小型集落 MRSA も他の菌株の分泌する因子によりその増殖能を回復する可能性が示された。T-1 株の増殖効果 (plating efficiency) を調べると、この株はお互いの増殖を feeding できる可能性が推測された。T-2, T-3 株は M-H 寒天培地にチミンやチミジンを添加すると増殖したことからチミジン依存性の SCVs であると考えられた。また、5% ヒツジ血液寒天培地での sulfamethoxazole-trimethoprim 感受性が耐性を示した。これらの結果から、この小型集落 MRSA はチミジン合成系を障害された株で、その障害度が表現型として不安定な集団から構成されている可能性が示唆された。

Key words: 小型コロニー変種, MRSA, 共培養, チミジン

はじめに

Staphylococcus aureus は普通寒天培地によく発育し、血液寒天培地では特徴的な集落を形成する。しかし、持続性、再発性の *S. aureus* 感染症においては抗菌薬の長期投与により小型のコロニーを形成 (小型コロニー変種 small colony variants; SCVs) することが報告されている^{1,2)}。SCVs はチミジンなどを要求する auxotrophy (栄養要求性変異株) の性状を示すことも知られている³⁻⁷⁾。また *S. aureus* は単一集落から

の colony purification を繰り返しても表現型として薬剤に対する感受性の異なる集団を含む場合があることもよく知られている⁸⁾。

われわれは、1995 年に敗血症患者から、分離を繰り返しても集落の大きさや形態が一定しない methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) の変異株の検出例について報告した⁹⁾。これらの株は 5% ヒツジ血液寒天培地 (血液寒天培地: 日水製薬) 上では大小の集落形成、fried egg 状の中央突起集落、集落内に小集落形成、また電子顕微鏡的に検査すると不均一な細胞壁を有するなどの特徴を示す。またコアグラゼ陽性、*mecA* 遺伝子保有など MRSA としての性状を有しているが、MRSA が一般的に発育可能な Mueller-Hinton II 寒天培地 (M-H 寒天培地: 日本ベクトン・デッキンソン) にほとんど発育しない。これらの株を血液寒天培地に低密度に接種し、増殖性の異なる菌の混入

著者連絡先: (〒683-8504) 米子市西町 36-1
鳥取大学医学部附属病院検査部
谷本綾子
TEL: 0859-34-8145
FAX: 0859-34-8132
E-mail: tanimoto-ttr@umin.ac.jp

がない条件で再分離して調べると、M-H寒天培地に発育する株と発育しない株に分けられた。発育しない株も *S. aureus* や *Staphylococcus epidermidis* など他の菌が産生・分泌する発育因子により増殖が誘導・促進され、また M-H 寒天培地にチミンやチミジンを追加すると集落形成が認められたので報告する。

材料と方法

1. 使用菌株

1995年に敗血症患者から分離し、dimethyl sulfoxide (DMSO: Wako) 10%添加の brain heart infusion broth (栄研化学) 内に -80°C で保存した株を用いた。この株は血液寒天培地上で、臨床分離 MRSA の特徴的な集落は示さず大小異質な集落を形成する。表現の異なる3株 (T-1: 微小集落, T-2: 極微小集落, T-3: 極微小集落) を再分離して使用した。

同定検査および薬剤感受性試験には、*S. aureus* ATCC 25923 と臨床分離 MRSA を対照菌株として用いた。共培養では、*S. aureus* ATCC 25923, 臨床分離 *S. epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* IID 1117, *Escherichia coli* B, *Salmonella* Enteritidis 116-54, 臨床分離 *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* IFO1835 を用いた。

2. 各種培地への発育性

被検菌を血液寒天培地に画線塗抹後、 35°C で2日間5%炭酸ガス培養を行い集落の性状を観察した。また被検菌を M-H 寒天培地、普通寒天培地 (栄研化学) に画線塗抹後、 35°C で3日間好気培養して集落形成の有無を調べた。

3. 同定検査

1) コアグラエーゼ試験

コアグラエーゼ産生能はコアグラエーゼ検査用ウサギプラスマ“栄研”(栄研化学)を用い試験管法で行った。

2) Oxacillin (MIPIC: BBL) 感受性試験

MIPICの感受性は滅菌生理食塩水で McFarland 0.5 に調整した菌液を、滅菌綿棒で Mueller-Hinton 5%ヒツジ血液寒天培地 (M-H 血液寒天培地: 日本ベクトン・デッキンソン) に塗布後にディスクを置き 35°C で一夜培養して調べた。

3) Penicillin-binding protein 2' (PBP 2') の検出

PBP 2'の検出には、スライドラテックス凝集反応による PBP 2'検出用キット MRSA-LA「生研」(デンカ生研)を用いた。

4) Pulse-field gel electrophoresis (PFGE) による遺伝子型解析

遺伝子型解析にはジーンパス試薬キット グループ

1 (Bio-Rad) と PFGE 電気泳動槽 CHEF DR II (Bio-Rad) を用いた。制限酵素には *Sma*I を使用した。ゲルはエチジウムブロマイド溶液で染色した後に紫外線照射下で写真撮影した。

4. 薬剤感受性試験

Sulfamethoxazole-trimethoprim (ST: BBL) の感受性試験は M-H 血液寒天培地を用いて MIPIC と同様な方法で実施した。

5. 他の細菌との共培養

M-H 寒天培地に発育しない T-2, T-3 株を滅菌生理食塩水で McFarland 0.5 に調整し、それぞれ M-H 寒天培地全面に塗布した上に直径 5 mm のろ紙を置き、そのろ紙に *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. Enteritidis*, *B. subtilis*, *C. albicans* を塗布して培養した。 35°C で3日間培養し、ろ紙周囲における T-2, T-3 株の発育を観察した。

6. 菌株の plating efficiency

HI 寒天培地で前培養した菌株を phosphate-buffered saline (PBS) に浮遊させ、McFarland 0.5 (1×10^8 CFU/ml) から 10 倍希釈列を作り、各希釈管から 0.2 ml ずつを HI 寒天培地と M-H 寒天培地に接種した。 35°C で3日間培養後、培地における集落数を比較した。

7. チミン・チミジン依存性

チミン (Nakalai) およびチミジン (Nakalai) の依存性を3種の方法で調べた。チミンとチミジンは 10 mg/ml に DMSO を用いて溶かし、使用にあたっては原液を PBS で希釈して用いた。実験に用いた濃度範囲では DMSO の影響は認められなかった。

1) ろ紙法

M-H 寒天培地に発育しない T-2 株を M-H 寒天培地全面に塗布し、その上に 1 cm^2 のろ紙 (東洋) を置き、ろ紙上に $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ のチミンおよびチミジン液の 0.1 ml を滴下し、 35°C 、4 日間の培養後にろ紙周辺の集落形成を調べた。

2) 希釈法

M-H プロス (Difco) でチミン、チミジンそれぞれの添加試薬の希釈列 (10, 5, 1, 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を作り、その希釈 well にそれぞれ最終濃度が 1.0×10^3 CFU/ml になるよう被検菌を加えて、 35°C で 24, 48 時間の培養を行った。well の混濁・沈澱より菌の増殖の有無を判定した。

3) 増殖曲線

M-H プロスにはチミン (10, 5, 1, 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、チミジン (10, 1, 0.5, 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を添加して、対照としては T-2 株が発育可能な HI プロス (日水製薬) を用いた。

それぞれの培地に被検菌を接種して 35°C で培養し、1 時間ごとに Klett 比濁計 (Summerson) を用いて 660 nm のフィルターで培地の透過度を測定して増殖曲線プロットした。

結 果

集落形態および各培地への発育性

T-1~T-3 の 3 株の性状および各種培地で集落形成能を表 1 に示した。T-1 株は血液寒天培地では *S. aureus* ATCC 25923 や臨床分離 MRSA に比較して小型で、大小不同の集落を形成することが特徴的であった。T-2 や T-3 株はより小型で、T-3 株は溶血性も示さなかった。

M-H 寒天培地に発育したのは *S. aureus* と MRSA と T-1 株であった。この T-1 株の集落は小型で、しかも接種菌量に対して少数の集落形成であった。普通寒天培地には対照菌株よりやや小型で大小不同ではあるが T-1~T-3 株はいずれも集落を形成した。

同定検査および ST 感受性試験

T-1~T-3 株のすべてが MIPIC 耐性であり、またコアグラゼ陽性、PBP 2' の検出により MRSA と同定した (表 2)。PFGE による遺伝子型解析において

T-1, T-2, T-3 株の泳動パターンに分離株間の差異は認められなかった (図 1)。

また ST 感受性試験では *S. aureus* および MRSA は感受性を示したが、T-1~T-3 株はすべて耐性であった (表 2)。

他の細菌との共培養

S. aureus, *S. epidermidis*, *E. coli*, *S. Enteritidis*, *C. albicans* を塗布したろ紙の辺縁には T-2, T-3 株の集落が形成された。*B. subtilis* の集落辺縁には発育が認められなかった。また *P. aeruginosa* の集落の辺縁に発育阻止帯、その外縁にドーナツ型に T-2, T-3 株の発育が認められた (図 2, 表 3)。

HI 寒天培地および M-H 寒天培地上での plating efficiency

HI 寒天培地ではすべての株が希釈された倍数に応じて集落を形成した。T-1 株は 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} の希釈系列において、HI 寒天培地の発育コロニー数 > 500, 238, 26 (CFU/plate) に比べ M-H 寒天培地での発育コロニー数は 213, 9, 0 (CFU/plate) と明らかな集落の減少を認め、M-H 寒天培地の集落は大小不同の形状を示した。T-1 株には HI 寒天培地の 238 (CFU/plate) に対して M-H 寒天培地ではその集団の

表 1 5%ヒツジ血液寒天培地の集落性状および各種培地での集落形成能

被検菌	5%ヒツジ血液寒天培地 ¹⁾		培地による発育性 ²⁾	
	集落性状 (色調・大きさ)	β 溶血	M-H 寒天培地	普通寒天培地
<i>S. aureus</i> ATCC25923	乳白色・2~3 mm	有	+	+
MRSA (臨床分離)	乳白色・2~3 mm	有	+	+
T-1	乳白色・微小	有	極小集落が少数	+
T-2	無色半透明・極微小	有	-	+
T-3	無色半透明・極微小	無	-	+

Note: ¹⁾ 5%ヒツジ血液寒天培地は 35°C で 2 日間 5%CO₂ 培養した。

²⁾ M-H 寒天培地、普通寒天培地は、35°C で 3 日間好気培養した。

表 2 小型集落 MRSA の性状および ST 感受性

被検菌	コアグラゼ産生能	PBP 2'	M-H 血液寒天培地による感受性	
			Oxacillin	ST
<i>S. aureus</i> ATCC25923	+	-	S	S
MRSA (臨床分離)	+	+	R	S
T-1	+	+	R	R
T-2	+	+	R	R
T-3	+	+	R	R

Note: S, susceptible; R, resistant

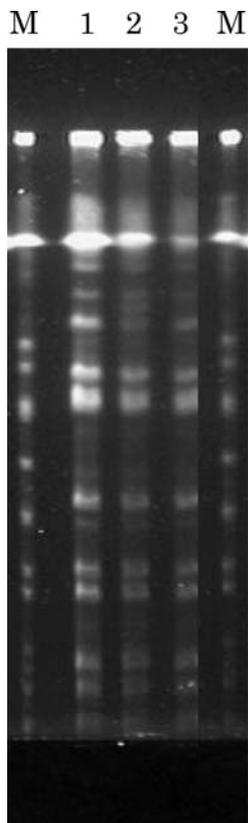


図1 分離菌 DNA のパルスフィールド電気泳動パターン
DNA を *Sma*I で切断し, PFGE で調べた。
M, λ ladder standard; 1, T-1 株; 2, T-2 株; 3, T-3 株

約 3% (9 CFU/plate) が発育でき, 接種量が高密度であれば相互の増殖を促進する feeding 集団があった。T-2 株, T-3 株では M-H 寒天培地では発育が認められなかった (表 4)。

チミン, チミジンの要求性のろ紙法での検査

M-H 寒天培地全面に塗布した T-2 株は, チミン, チミジン含有ろ紙の周囲に明瞭な発育帯を形成した (図 3)。

チミン, チミジン要求性の希釈法による検査

T-2 株, T-3 株の増殖に必要な最少濃度は, チミンが約 10 μ g/ml, チミジンが約 0.04 μ g/ml であった。T-1 株については T-2 株や T-3 株のチミンやチミジンの要求性は低いレベルであった (表 5, 6)。T-2 株や T-3 株はその増殖においてチミジン依存性が強く, チミンも大量に添加された場合は増殖が回復した。

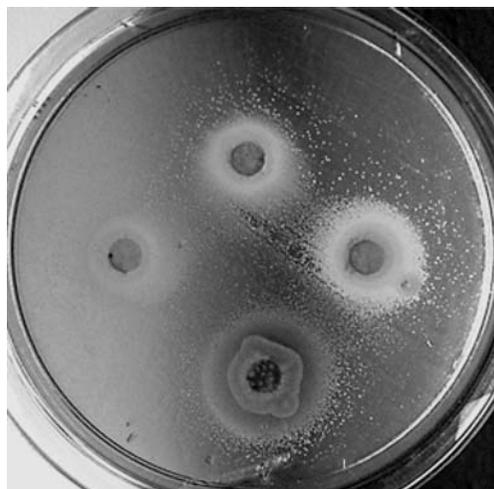


図2 T-3 株と 4 種の細菌の共培養
写真で上が *S. aureus*, 右が *S. epidermidis*, 左が *E. coli*, 下が *P. aeruginosa* を示す。

表 3 小型集落 MRSA と他の細菌との共培養による発育

共培養菌 ^a	被検菌	
	T-2	T-3
<i>S. aureus</i>	発育	発育
<i>S. epidermidis</i>	発育	発育
<i>P. aeruginosa</i> ^b	発育	発育
<i>E. coli</i>	発育	発育
<i>S. Enteritidis</i>	発育	発育
<i>B. subtilis</i>	非発育	非発育
<i>C. albicans</i>	発育	発育

Note: ^a: 菌株の詳細については本文の材料と方法を参照

^b: ドーナツ型発育帯については本文の結果を参照

チミン, チミジン添加 M-H プロスでの増殖曲線

T-2 株は M-H プロスでは発育しないが, チミンあるいはチミジンを添加して培養すると増殖した (図 4)。HI プロスでの増殖陽性対照と比較して, 添加群ではチミン 10 μ g/ml, チミジン 1 μ g/ml で同様の増殖性を示した。希釈法と比較するとチミジン濃度は高いレベルを要求した。

考 察

S. aureus は普通寒天培地でよく発育する菌として知られている。また高い耐塩性やコアグラーゼ産生,

表4 小型集落 MRSA に対する各培地の plating efficiency

培地		希釈列・CFU/plate					
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
T-1 株	HI 寒天	500<	500<	500<	500<	238	26
	M-H 寒天	500<	500<	500<	213	9	0
T-2 株	HI 寒天	500<	500<	500<	500<	216	18
	M-H 寒天	0	0	0	0	0	0
T-3 株	HI 寒天	500<	500<	500<	500<	255	28
	M-H 寒天	0	0	0	0	0	0

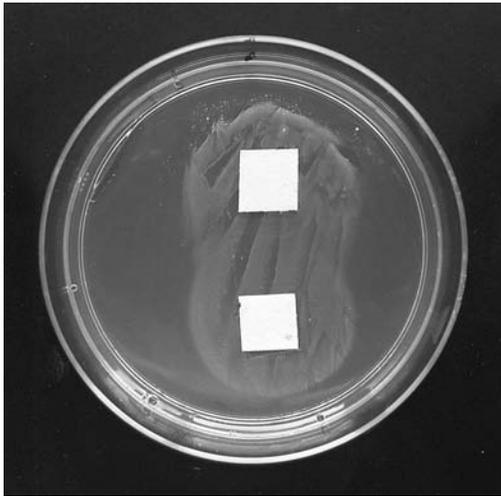


図3 T-2 株のチミン、チミジン要求性
写真の上段の紙はチミン(10 μg), 下段の紙
はチミジン(10 μg)を示す。

ブドウ糖, 乳糖, 麦芽糖およびマンニットを分解して酸を産生するなどの特徴を示す。特にマンニット分解性は他菌種との鑑別に重要であるとされている。分離した T-1~T-3 株も普通寒天培地に発育し, コアグラゼ産生, 耐塩性, 乳糖やマンニットの分解性など *S. aureus* としての特徴を多く有している。しかし, 一般的な *S. aureus* と異なりこの T-1~T-3 株は集落の大きさやその形態が多様であり, 再分離しても多くは親株に類似した形態を示すものの不安定で一定の集落を形成しない。M-H 血液寒天培地で実施した感受性試験の結果より MPIPC 耐性であること, さらに PBP 2' を保有していることから MRSA の一種であることは否めない。また PFGE で遺伝子型を調べると同一のパターンを示すことから形質が不安定な variant の集団すなわち SCVs であると思われる。

Clinical and Laboratory Standards Institute

(CLSI: NCCLS) は薬剤感受性試験用培地として M-H 寒天培地を指定している¹⁰⁾。M-H 寒天培地や MRSA スクリーニング培地に発育しない MRSA の変異株は, CLSI に準拠した薬剤感受性試験ができないことや methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) として見逃される可能性があるため注意が必要であることが既に報告されている^{11, 12)}。T-1 株以外の T-2 株や T-3 株は M-H 寒天培地に発育できないので微生物検査室で通常の薬剤感受性試験はできない。さらにこれらの株の親株は MRSA スクリーニング培地にほとんど発育しなかった⁹⁾ことから, これらの株も MSSA と誤同定される可能性も含んでいる。

T-2, T-3 株を他の菌種と M-H 寒天培地で共培養した場合, 発育が認められた菌種 *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *S. Enteritidis*, *C. albicans* は, T-2, T-3 株の増殖因子を分泌している可能性を示した。*B. subtilis* が抗菌因子を産生することは知られているが, *B. subtilis* で発育帯形成の認められない理由はその抗菌因子の分泌による可能性がある。*P. aeruginosa* の場合はドーナツ型の発育帯を示すことから抗菌因子と発育促進因子の両者の分泌があることが推測される。

Plating efficiency の結果からは, T-1 株の一部は独立的に増殖できる集団とその集団より feeding を受けて増殖できる集団が混在している可能性が考えられる。他方 T-2 株と T-3 株は feeding できる集団を含まないことが考えられるが, これらの株は他の *S. aureus* や *S. epidermidis* との共培養で増殖を回復するので, この株は表現型レベルで feeding できる集団を内在している株と推測される。

いずれにしてもこれらの小型集落 MRSA は他の細菌群が分泌する発育促進因子により十分発育することが考えられる。すなわち *S. aureus* に比較して増殖的には劣性ではあるが, 生体内で種々の常在菌が存在す

表5 Thymine 量と増殖

菌株	培養時間	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)									
		10	5	2.5	1.25	0.63	0.32	0.16	0.08	0.04	0.02
T-1	24h	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48h	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
T-2	24h	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48h	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T-3	24h	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48h	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Note: +は発育, -は非発育

表6 Thymidine 量と増殖

菌株	培養時間	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)									
		0.32	0.16	0.08	0.04	0.02	0.01	0.005	0.003	0.002	0.001
T-1	24h	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	48h	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
T-2	24h	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	48h	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
T-3	24h	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	48h	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

Note: +は発育, -は非発育

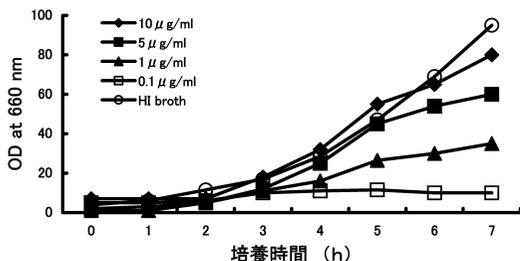
る場合や混合感染の場合には十分増殖して、本来の MRSA の病原性や薬剤耐性を示すと考えられる。カリニ肺炎の予防薬として ST を多用される AIDS 患者が SCVs による致命的な感染症を引き起こした事例も報告されており¹³⁾, ST の多用患者などは培養検査において注意すべき患者情報である。

患者から分離される MRSA の小型集落ではチミジン依存性の株がしばしば検出され、形態学的変化また自己融解の誘導が報告されている^{4, 14)}。T-1~T-3 株も代謝に障害をもち、抑えられた増殖性、増殖因子依存性や自己融解の招来などの形質をもっている可能性が考えられる。また T-2, T-3 株は M-H 寒天培地に発育せずチミジン要求性を示した。CLSI はチミンまたはチミジンを含んだ培地は ST の偽耐性の原因になることから、できる限りチミジン量の低い濃度の M-H 寒天培地の使用を推奨している¹⁰⁾。普通寒天培地や HI 寒天培地にはペプトンが使用されており、一般的なペプトン (Difco) は $413 \mu\text{g/g}$ のチミジンを含んでいることから、これらの培地には約 $4 \mu\text{g/ml}$ のチミジン含有していることになる。つまり T-2, T-3 株はチミジン量が抑えられた M-H 寒天培地では増殖できない

が、ペプトンを含む培地ではよく発育することが説明できる。

細菌は ST で葉酸合成が抑制されると増殖できないが、SCVs には hemmine, menadione, thymidine に依存して増殖を示す株が多数報告されている^{3, 5, 7)}。チミジン要求性の SCVs はチミジンを生合成できないが、外部から取り込んで増殖できる^{3, 5, 7)}。今回用いた T-1~T-3 株は ST を長期間投与されていた患者から分離され⁹⁾, ST 耐性でチミジン依存性であった。cystic fibrosis (CF) の患者においてチミジン依存性 *S. aureus* が検出され、その患者が長期間にわたって ST の投与を受けていた報告もある^{2, 4)}。国内でも ST による誘導が考えられる小型集落 MRSA を岩川らが報告しているが¹¹⁾, 外国に比較して少ない。その理由の一つとして本邦では ST の MRSA 感染症に対し保険適応がないこと、適応のあるカリニ肺炎の症例が多くはないこと、CF 患者が少ないことなどが考えられる。しかし ST は MRSA 感染症への適応はないものの、vancomycin (VCM) と teicoplanin, arbekacin と並んで MRSA に優れた抗菌力を示すため¹⁵⁾, 臨床の現場では使用される場合がある。近年 VCM 耐性

A. Thymine量とT-2株の増殖曲線



B. Thymidine量とT-2株の増殖曲線

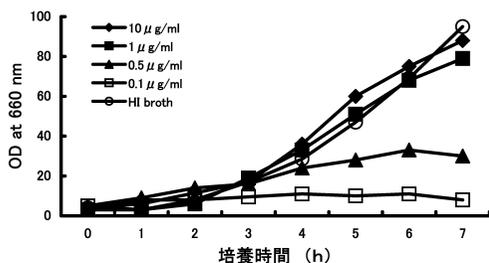


図4 チミン、チミジンを添加した M-H プロスと HI プロスでの T-2 株の増殖曲線

細菌は最終的に 1×10^7 CFU/ml となるよう培地で調整し、振とう培養をした。グラフ A はチミン、グラフ B はチミジンを添加した増殖曲線を示す。

MRSA が臨床材料から分離されたことから¹⁶⁾、VCM の使用が制限され、ST の使用が増加することも予測される。また MRSA を保菌した患者が他の疾患の治療のため ST を長期間投与された場合、臨床材料から MRSA で SCVs が検出されることが増加する可能性もある。

T-1~T-3 株のような SCVs が臨床材料から分離された場合、自動機器では T-2 株や T-3 株のようにグロスコントロールに発育しないことがあるため同定検査や薬剤感受性試験が困難である。また発育しても MRSA を MSSA とあるいは他の菌種と誤同定されることも考えられる。微生物検査室では患者情報や抗菌薬使用情報を入手し、ST を長期投与された患者からはこのような MRSA の SCVs が検出される可能性があることを認識し、見逃さないことや誤同定しないように十分注意すべきと考える。

謝辞 稿を終えるにあたり、ご指導とご校閲を賜りました鳥取大学医学部保健学科の高山壽雄教授に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Proctor, R. A., J. M. Balwit, O. Vesga. 1994. Variant subpopulations of *Staphylococcus aureus* as cause of persistent and recurrent infections. *Infect. Agents Dis.* 3: 302-312.
- 2) Kahl, B., M. Herrmann, A. S. Everding, et al. 1998. Persistent infection with small colony variant strains of *Staphylococcus aureus* in patients with Cystic Fibrosis. *J. Infect. Dis.* 177: 1023-1029.
- 3) Bulger, Roger J. 1969. *In Vitro* Studies on Highly Resistant Small Colony Variants of *Staphylococcus aureus* Resistant to Methicillin. *J. Infect. Dis.* 120: 491-493.
- 4) Gilligan, P. H., P. Gage, D. F. Welch, et al. 1987. Prevalence of Thymidine-Dependent *Staphylococcus aureus* in Patients with Cystic Fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* 25: 1258-1261.
- 5) Jonsson, Ing-Marie, C. V. Eiff, R. A. Proctor, et al. 2002. Virulence of a *hemB* mutant displaying the phenotype of a *Staphylococcus aureus* small colony variant in a murine model of septic arthritis. *Microbial Pathogenesis* 34: 73-79.
- 6) Eiff, C. V., G. Lubritz, C. Heese, et al. 2003. Effect of trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis in AIDS patients on the formation of the small colony variant phenotype of *Staphylococcus aureus*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 48: 191-194.
- 7) Kipp, F., K. Becker, G. Peters, et al. 2004. Evaluation of Different Methods to Detect Methicillin Resistance in Small-Colony Variants of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 42: 1277-1279.
- 8) Hiramatsu, K., N. Aritaka, H. Hanaki, et al. 1997. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* 350: 1670-1673.
- 9) 谷本綾子, 北垣良憲, 日浦 節, 他. 1995. 敗血症患者から検出した fried egg 状集落を呈する Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *臨床病理* 43: 1061-1065.
- 10) CLSI. 2005. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eighth Edition M2-A8: 4.1.4 Effects of Thymidine or Thymine.
- 11) 岩川こずゑ, 奥住捷子. 2002. 血液寒天培地上に透明微小集落を形成し、Mueller-Hinton に発育不良な MRSA について. *日本臨床微生物学誌* 12:

- 128-134.
- 12) 菊池 賢, 朴 春成, 柄沢利子, 他. 2002. MRSA 検出の落とし穴. 感染症学雑誌 76: 250.
- 13) Seifert, H., C. V. Eiff, et al. 1999. Fatal Case Due to Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants in an AIDS Patient. *Emerg. Infect. Dis.* 5: 450-453.
- 14) Kahl, B., G. Belling, R. Reichelt, et al. 2003. Thymidine-Dependent Small-Colony Variants of *Staphylococcus aureus* Exhibit Gross Morphological and Ultrastructural Changes Consistent with Impaired Cell Separation. *J. Clin. Microbiol.* 41: 410-413.
- 15) 吉田 勇, 木村美司, 東山伊佐夫, 他. 2003. 各種抗菌薬に対する臨床分離株の感受性サーベイランス. 日本化学療法学会雑誌 51: 129-207.
- 16) Sievert, D. M., et al. 2002. *Staphylococcus aureus* Resistant to Vancomycin, United States. *MMWR* 51: 565-567.

Properties of Thymidine-Dependent MRSA Strains

Ayako Tanimoto,¹⁾ Hiromitsu Fujiwara,¹⁾ Yuko Tanaka,¹⁾ Sachiko Nakamoto²⁾

¹⁾ Department of Clinical Laboratory, Tottori University Hospital, Yonago 683-8504, Japan

²⁾ Department of Pathological Science and Technology, School of Health Science, Tottori University, Yonago 683-8503, Japan

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from a patient with septicemia at Tottori University Hospital, Yonago in 1995 formed characteristic colonies of small and irregular size, even after repeated isolation of these colonies. The colonies were re-isolated and characterized as small colony variants (SCVs). A minority of the re-isolated T-1 strain population were able to form colonies of irregular size on Mueller-Hinton (M-H) agar media, while the other strains (T-2 and T-3 strains) were unable to form such colonies. All strains possessed characteristics typical of *S. aureus* and MRSA and, moreover, the PFGE profiles of *Sma*I-digested DNA of these strains were almost identical. Therefore, although these strains had different phenotypical properties, they were variants with a clonal relationship. Co-cultivating of the strains with *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Escherichia coli* or *Salmonella* Enteritidis on M-H agar led to strong growth and colony formation. These results suggest that the growth of small colony variants (SCVs) of MRSA can be restored by factors released from other bacteria. A certain fraction of the population of T-1 clones showed a feeding-related growth effect in the M-H agar medium, while other T-1 clones did not respond to feeding, even if they were inoculated at high bacterial density on M-H agar. The clones which could not form colonies on M-H agar were able to colonize when they were incubated on M-H agar supplemented with thymine or thymidine. Examination of antimicrobial susceptibility to sulfamethoxazole-trimethoprim (ST) was carried out using M-H agar containing sheep blood. All clones were resistant to ST. Based on these results, it seems probable that SCVs of MRSA are defective in thymidine synthesis, and are composed of phenotypes that exhibit instability in proportion to the degree of this defect.

Key words: SCVs, MRSA, co-culture, thymidine